



УДК 575.224.22

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИРОДЫ МУТАЦИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ  
В 12-М ЭКЗОНЕ ФЕНИЛАЛАНИНГИДРОКСИЛАЗНОГО ГЕНА  
У БОЛЬНЫХ ФЕНИЛКЕТОНУРИЕЙ

Скрябин В. В., Ковальчук Л. А., Хальчицкий С. Е.\*,  
Гольцов А. А.\*, Кабоев О. К.\*, Плуталов О. В.\*\*,  
Берлин Ю. А.\*\*, Шварц Е. И.\*

Медицинский институт МЗ ЛатвССР, Рига;

\* Ленинградский институт ядерной физики Академии наук СССР,  
Гатчина, Ленинградская область;

\*\* Институт биоорганической химии им. М. М. Шелякина Академии наук СССР,  
Москва

Актуальной проблемой молекулярной генетики человека является выяснение природы мутационных повреждений при моногенной патологии. К числу наиболее распространенных наследственных болезней относится фенилкетонурия, аутосомно-рецессивное заболевание, в основе которого лежит нарушение превращения фенилаланина в тирозин вследствие дефекта фенилаланин-гидроксилазного гена [1, 2]. Ранее была установлена нуклеотидная последовательность кодирующей части этого гена, оказавшегося высокоинтропированным: на долю 12 экзонов приходится около 2400 п.о. (кодирующих белок размером в 451 аминокислотный остаток) из общего числа более 90 000 п.о. [3]. Анализ полиморфизма длины рестриционных фрагментов позволил выявить более 40 гаплотипов, часть которых ассоциируется с развитием заболевания [4]. При секвенировании были обнаружены точечные мутации, обуславливающие развитие фенилкетонурии, в том числе транзиции G→A в донорном сайте сплайсинга 12-го интрона [5] и C→T в 12-м экзоне [6]. Поскольку эти мутации расположены довольно близко друг к другу, можно путем амплификации *in vitro* получить фрагмент геномной ДНК, в котором встречаются обе мутации, а затем проанализировать этот фрагмент с помощью аллельспецифической гибридизации и секвенирования. В настоящей работе мы использовали этот подход для идентификации одной из упомянутых выше мутаций в геноме больных фенилкетонурией на территории Латвии.

Диагноз фенилкетонурии основывался на данных клинического и биохимического анализов. ДНК выделяли из лейкоцитарной суспензии периферической крови членов двух семей (пробанд и его мать) по методу [7]. Олигонуклеотидные праймеры и зонды синтезировали твердофазным фосфамидитным методом из 3'-(β-цианэтил-N,N-дизопропил)фосфамидитов N-защищенных 2'-дезоксилуклеозидов по модифицированному методу [8]; после завершения синтеза, снятия с носителя и полного деблокирования олигонуклеотиды выделяли электрофорезом в 20% ПААГ и анализировали в виде [5'-<sup>32</sup>P]фосфатов.

В качестве праймеров использовали два 20-членика — dATGCCACT·GAGAАСТСТСТТ и dAGTCTTCGATТАCTGAGAAA, фланкирующие 12-й экзон фенилаланин-гидроксилазного гена. Исследуемую ДНК (0,5 мкг) отжигали (7 мин при 97°С и 1 мин при 55°С) с двумя праймерами (0,3 мкг каждого) в 50 мкл инкубационной смеси, содержащей 67 мМ трис-HCl (pH 8,8), 6,7 мМ MgCl<sub>2</sub>, 16,6 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6,7 мМ EDTA, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 170 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина и все четыре dNTP (1,5 мМ каждый), прибавляли 2 ед. акт. термостабильной ДНК-полимеразы *Thermus thermophilus* и проводили синтез (2 мин

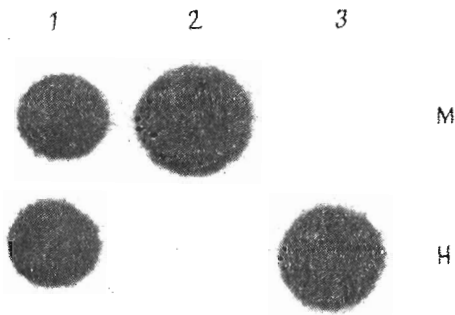


Рис. 1. Аллельспецифическая гибридизация геномной ДНК человека с нормальным (Н) и мутантным (М) зондами на фенилкетонурию (С→Т-транзиция в 12-м экзоне). 1 — ДНК матери, 2 — ДНК пробаанда, 3 — контроль

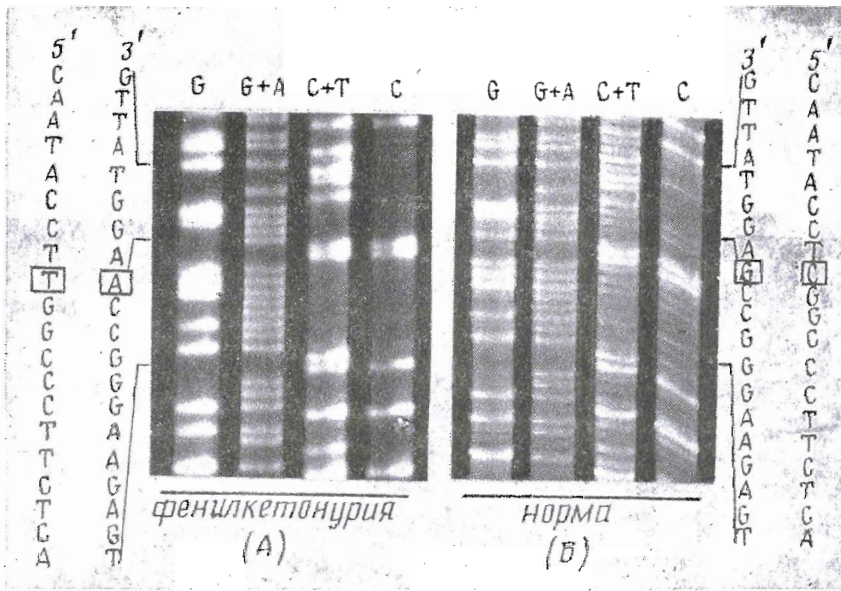


Рис. 2. Анализ по Максему — Гилберту первичной структуры участка 12-го экзона фенилаланингидроксилазного гена у больного фенилкетонурией, содержащего патогенную мутацию (С→Т-транзиция) (А) и в контроле (В)

при 72°С), а затем 30 циклов амплификации (денатурация — 1 мин при 92°С, отжиг — 1 мин при 55°С, элонгация — 2 мин при 72°С). Анализ реакционной смеси электрофорезом в 6% ПААГ показал наличие продукта амплификации (общее количество ~1 мкг) ожидаемого размера (245 п.о.).

Для аллельспецифической гибридизации использовали 21-звенные зонды, отвечающие транзиции С→Т в 12-м экзоне и симметричные (по длине) относительно точку мутации, — нормальный зонд dCACAATAC·CTCGGCCCTTCTC, гомологичный смысловой цепи, и комплементарный ему мутантный зонд dGAGAAGGCCCAAGGTATTGTG (ср. [6]); выбор комплементарной (а не смысловой) последовательности в этом случае позволяет избежать образования пары Т:С с участием центрального звена мутантного зонда и нормальной ДНК, повышающей устойчивость несовершенного дуплекса и тем самым уменьшающей специфичность гибридизации. Дот-гибридизацию проводили на нейлоновых фильтрах с диаметром пор 0,2 мкм, предварительно обработанных 0,4 М NaOH, 0,6 М NaCl; амплифицированный материал в 0,4 М NaOH, 12 мМ EDTA наносили на фильтр из расчета 1/20 реакционной смеси в пятно, фильтр подвергали УФ-облучению (254 нм, 30 с) для иммобилизации ДНК, промывали 5 мМ

EDTA и 7×SSPE (1 M NaCl, 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7 mM EDTA) и проводили предгибридизацию с денатурированной и частично деградированной с помощью ультразвука ДНК из спермы лосося (2 ч при 65°С в 7×SSPE, 7% SDS), а затем гибридизацию в том же растворе (14 ч при 59°С) с 5'-<sup>32</sup>P-мечеными зондами (1 нг/см<sup>2</sup> фильтра, 10<sup>5</sup> имп/мин·нг; отмывка 7×SSPE, 0,1% SDS 2 раза при 20°С и 2 раза по 2 мин при 59°С).

В случае обеих семей (приведены данные для одной из них, см. рис. 1) продукт амплификации ДНК матери гибридизовался как с нормальным, так и с мутационно измененным зондом, а у пробанда гибридизация происходила только с мутантным зондом. Это означает, что мать является гетерозиготным носителем мутантного гена, тогда как пробанд гомозиготен по данной мутации. Наличие мутации в 12-м экзоне фенилаланингидроксилазного гена в исследованных образцах было подтверждено секвенированием продукта амплификации, избирательно меченного <sup>32</sup>P по 5'-концу одной из цепей (рис. 2).

Таким образом, в составе ДНК больного фенилкетонурией и его матери было показано наличие транзиции С→Т, приводящей к замене в 408-м положении фенилаланингидроксилазы остатка аргинина на триптофан. Выявление мутации использованным нами методом делает возможной пренатальную диагностику этого заболевания.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Scriber C., Clow C. L.* // *Ann. Rev. Genet.* 1980. V. 14. P. 179–202.
2. *Woo S. L. C.* // *Biochemistry.* 1989. V. 28. № 1. P. 1–7.
3. *DiLella A. G., Kwok S. C. M., Ledley F. D., Marvit J., Woo S. L. C.* // *Biochemistry.* 1986. V. 25. № 4. P. 743–749.
4. *Woo S. L. C.* // *Amer. J. Hum. Genet.* 1988. V. 43. № 5. P. 781–783.
5. *DiLella A. G., Marvit J., Lidsky A. S., Güttler F., Woo S. L. C.* // *Nature.* 1986. V. 322. № 6082. P. 799–803.
6. *DiLella A. G., Marvit J., Brayton K., Woo S. L. C.* // *Nature.* 1987. V. 327. № 6120. P. 333–336.
7. *Woodhead J. L., Fallon R., Figueiredo H., Langdale J., Malcolm A. D. B.* // *Human Genetic Diseases. A Practical Approach*/Ed. Davies K. E. Oxford: IRL Press, 1986. P. 56–57.
8. *Sinha N. D., Biernat J., McManus J., Köster H.* // *Nucleic Acids Res.* 1984. V. 12. № 11. P. 4539–4557.

Поступило в редакцию  
4.IX.1989

#### IDENTIFICATION OF A MUTATION IN THE 12TH EXON OF THE PHENYLALANINE HYDROXYLASE GENE IN PATIENTS WITH PHENYLKETONURIA

SKRYABIN B. V., KOVAL'CHUK L. A., KHAL'CHITSKII S. E.\*, GOL'TSOV A. A.\*,  
KABOEV O. K.\*, PLUTALOV O. V.\*\*\*, BERLIN Yu. A.\*\*\*, SCHWARTZ E. I.\*

*Medical Institute, Health Ministry of the Latvian SSR, Riga:*

\* *Leningrad Institute of Nuclear Physics, Academy of Sciences of the USSR,  
Gatchina, Leningrad Region:*

\*\* *M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow*

Upon amplification in vitro of the 12th exon area of the human phenylalanine hydroxylase gene followed by allele-specific hybridisation of the amplification product with synthetic probes and its sequencing by the Maxam – Gilbert method, a C→T transition causing phenylketonuria has been identified in Latvian patients.